Dosage des mycotoxines dans les produits oléagineux

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 10, Numéro 4, 306-8, JUILLET-AOÛT 2003, Problématiques actuelles dans le domaine de l'analyse des oléagineux et des corps gras

Auteur(s) : Marie-Paule HERRY , Laboratoire DGCCRF de Rennes, 26, rue Antoine Joly, 35000 Rennes, France Tél. : 02-99-14-37-14 Télécopie : 02-99-54-92-07 <marie-paule.herrydgccrf.finances.gouv.fr> .

Author(s) : Marie-Paule HERRY

Résumé : La présence de mycotoxines dans les produits végétaux et notamment dans les produits oléagineux est liée à la présence de souches toxinogènes de moisissures. Les échanges commerciaux et les récentes crises alimentaires ont créé un besoin de réglementer les contaminants et notamment les mycotoxines. Les nouvelles directives communautaires tiennent compte de l'hétérogénéité de la dispersion des mycotoxines dans les denrées alimentaires et définissent les modes d'échantillonnage. Dans le cas des produits oléagineux, le poids de l'échantillon varie de 3 à 30 kilogrammes. La préparation de tels échantillons doit être réalisée dans les laboratoires. Depuis une dizaine d'années, les colonnes d'immuno-affinité sont disponibles. Des méthodes analytiques les utilisant sont testées collaborativement au niveau des teneurs maximales admissibles fixées par la Commission.

Summary : The presence of mycotoxins in plant products, especially in oilseed products, is due to toxinogenous moulds. The recent food crisis created a need of regulation in food contaminants such as mycotoxins. The heterogeneity of the mycotoxins dispersion in food has been established. The recent directives take this fact into account and define the sampling plans. In the case of oilseed products, the weight of the sample varies from 3 to 30 kilograms. Such samples have to be prepared in laboratories have been immuno-affinity columns submitted available for a few years. The analytical methods have been subjected to collaborative studies and are appropriate to the recent regulation.

Mots-clés : mycotoxines, dosage, échantillonnage, colonne d'immuno-affinité, réglementation.

Keywords : mycotoxins, analysis, sampling, immuno-affinity column, regulation.

ARTICLE

Auteur(s) : Marie-Paule HERRY

Laboratoire DGCCRF de Rennes, 26, rue Antoine Joly, 35000 Rennes, France
Tél. : 02-99-14-37-14
Télécopie : 02-99-54-92-07
<marie-paule.herry@dgccrf.finances.gouv.fr>

Introduction

Les crises alimentaires qui se sont succédées récemment (vache folle, dioxine…) ont conduit la Commission européenne à compléter la réglementation des contaminants des denrées alimentaires. Ainsi depuis 1998, les mycotoxines font l'objet de travaux communautaires.
Les mycotoxines sont des substances toxiques élaborées par des champignons microscopiques dans les produits végétaux. Parmi les 200 000 espèces de moisissures recensées dans le monde, plus de 200 sont capables de produire des mycotoxines. Les *Aspergillus,* les *Penicillium,* les *Fusarium* sont bien représentés parmi les genres susceptibles d'héberger des espèces toxinogènes.
Les conditions de production des mycotoxines sont dépendantes des souches de moisissures, du substrat sur lequel elles se développent, des conditions climatiques de production, et de récolte ainsi que des conditions de stockage des denrées alimentaires. Parmi les 300 mycotoxines identifiées, une vingtaine a été isolée de produits végétaux naturellement contaminés à des teneurs et des fréquences significatives. Les plus étudiées sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, la zéaralénone, la patuline, les fumonisines, les trichothécènes. De nombreuses denrées dont les céréales, les fruits séchés, les fruits oléagineux, les épices, le cacao, le café, le jus de pomme et les vins… ont été trouvés contaminées.
Deux caractéristiques liées aux conditions d'élaboration des mycotoxines ont orienté les travaux de la Commission et ont dicté la rédaction des étapes à suivre pour le traitement de l'échantillon de laboratoire :
– Leur répartition dans les graines ou les fruits peut être très hétérogène. Une faible quantité de graines peut être contaminée mais ces graines contaminées peuvent contenir de très fortes concentrations en mycotoxines : l'échantillonnage et la préparation de l'échantillon sont deux points particulièrement importants pour l'estimation de la teneur en mycotoxines.
– La détection de ces traces de mycotoxines dans une matrice souvent complexe (matières grasses, pigments…) nécessite des techniques analytiques suffisamment sensibles. En effet, la réglementation fixe des teneurs maximales admissibles de 2 µg/kg en aflatoxine B1 et 4 µg/kg pour la somme des aflatoxines dans les produits destinés à la consommation humaine directe.

Préparation d'un échantillon prélevé selon la directive 98/53/CE de la Commission du 16 juillet 1998

Les nouvelles directives communautaires [1-3] traitant du contrôle des mycotoxines précisent :
– En annexe I, les modalités d'échantillonnage : les quantités à prélever en fonction de la taille des lots et par type de produit, les dispositions spécifiques à certains produits, les critères d'acceptation des lots.

– En annexe II, la préparation des échantillons de laboratoire et les critères généraux auxquels doivent satisfaire les méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en aflatoxines de certaines denrées alimentaires.

Dans le cas du dosage des aflatoxines dans les produits oléagineux, la directive 98/53/CE de la Commission précise la taille de l'échantillon qui varie de 3 à 30 kilogrammes en fonction de l'importance du lot à contrôler. Chaque échantillon dont le poids est supérieur à 10 kilogrammes doit être divisé en 3 sous-échantillons. Chacun des sous-échantillons sera préparé et analysé et les trois résultats d'analyse seront pris en compte pour accepter ou non la conformité d'un lot. Les limites maximales fixées par le règlement (CE) n° 466/2001 s'appliquent à la partie comestible et par

conséquent il faut estimer le poids des amandes dans l'échantillon global en décortiquant une centaine de graines et en mesurant le rapport poids des fruits entiers sur poids des amandes. La totalité de l'échantillon reçu au laboratoire doit être utilisée. “Chaque échantillon de laboratoire prélevé est broyé finement et soigneusement mélangé selon une méthode garantissant une homogénéisation complète” précise la directive. Le but est donc de réduire chacun des sous-échantillons en fines particules puis de disperser de façon homogène les particules contaminées dans l'ensemble de la masse du sous-échantillon. Cette étape est cruciale pour l'établissement de la teneur représentative en mycotoxines de l'échantillon. Pour atteindre ce but chacun des sous-échantillons est mixé en présence d'eau à l'aide d'un broyeur-homogénéiseur industriel (exemple : broyeur-homogénéiseur Silverson modèle DX) afin d'obtenir une pâte. Dans le cas des fruits oléagineux le broyage pendant 30 minutes après ajout de 15 kilogrammes d'eau pour 10 kilogrammes d'échantillon donne de bons résultats. Dans le cas des arachides en coque, il est conseillé de doubler la quantité d'eau ajoutée et d'assurer manuellement le brassage de la pâte de manière à garantir l'homogénéité de la dispersion des aflatoxines dans la masse. A partir de cette pâte on procède à la prise des échantillons pour essais sur lesquels vont être effectuées les analyses. L'homogénéité de la dispersion est vérifiée en analysant plusieurs prises d'essai issues de la masse de pâte. La validation du procédé de broyage et d'homogénéisation doit être effectuée dès lors qu'un nouveau produit est à contrôler. On peut également préparer l'échantillon, sans ajout d'eau, à l'aide d'un broyeur à mâchoire de grande capacité (exemple : broyeur Ras Mill Romer) mais dans ce cas l'homogénéité de la dispersion des mycotoxines dans l'échantillon est plus difficile à obtenir. Pour les noix à coque très dures le concassage à l'aide de ce broyeur est nécessaire avant la transformation en pâte.

Dosage des mycotoxines

Les méthodes de référence pour l'analyse des mycotoxines suivent toutes le même schéma analytique : extraction de la mycotoxine de l'échantillon préparé, purification de l'extrait obtenu et détection et dosage de cette mycotoxine.

Extraction

Pour permettre de détecter des teneurs en mycotoxines très basses, les prises d'essai d'échantillons sont importantes, de l'ordre de 25 à 50 grammes. Les solvants d'extraction sont des solvants organiques permettant d'extraire les mycotoxines de la matrice dans lesquelles elles ont été synthétisées. Le chloroforme, l'acétate d'éthyle, des solutions aqueuses de méthanol ou d'acétonitrile… font partie des solvants employés. Les extractions se font pendant des temps très courts (à l'aide d'Ultra Turrax ou de Waring Blendor) ou pendant des temps de l'ordre de 30 minutes par agitation magnétique.

Purification

Cette étape est nécessaire pour permettre la concentration de l'extrait purifié et augmenter ainsi la sensibilité de la méthode. On utilise des colonnes SPE *(Solid Phase Extraction)* remplies de silice, de Florisil, de silice greffée comme pour le dosage de l'aflatoxine B1 dans les matières premières et aliments des animaux [4], de silice échangeuse d'anions pour le dosage des fumonisines [5] ou encore des colonnes de charbon actif-alumine pour le dosage des trichothécènes. La production d'anticorps dirigés contre les mycotoxines a fait évoluer les techniques analytiques de

façon considérable. Leur utilisation est apparue il y a une dizaine d'années, permettant l'avènement de méthodes rapides sous forme de kits ELISA ou de techniques utilisables sur le terrain. (Voir chapitre développé par Monsieur Sarrazin.) Ces anticorps sont également greffés sur un gel contenu dans des colonnes. Ces colonnes d'immuno-affinité sont donc spécifiques d'une mycotoxine. Il en existe pour la plupart des mycotoxines comme les aflatoxines B&G, l'aflatoxine M1, l'ochratoxine, la zéaralénone, les fumonisines, le déoxynivalénol. A ce jour il n'existe pas de colonnes d'immuno-affinité destinées au dosage de la patuline, celle-ci étant une molécule trop petite pour initier des anticorps.

Les protocoles analytiques des méthodes de référence qui les utilisent précisent leur mode d'emploi. Dans une colonne, les anticorps sont présents en quantité limitée et ne peuvent donc fixer qu'une quantité limitée de molécules de mycotoxines. Concrètement, dans le cas d'un échantillon très contaminé, il faut rester vigilant à ne pas dépasser la capacité maximale de fixation de la colonne au risque de sous-doser la concentration en mycotoxines. Dans ce cas, il est nécessaire de diluer l'extrait d'échantillon avant l'étape de purification. Ces colonnes ont permis l'utilisation de mélanges aqueux pour les étapes d'extraction et purification au lieu des solvants organiques utilisés souvent en grande quantité dans les méthodes de référence de la génération précédente.

Ces colonnes sont faciles d'utilisation, elles permettent une excellente purification et donnent de bons résultats quantitatifs. Les nouvelles méthodes à l'étude ou en cours de normalisation font appel aux colonnes d'immuno-affinité quand elles existent.

Détection et dosage

Depuis une vingtaine d'années, les techniques de détection et de dosage nécessaires pour répondre au besoin de contrôle ou d'autocontrôle n'ont cessé d'évoluer. La chromatographie sur couche mince a été utilisée pendant longtemps mais, par cette technique, il est devenu difficile de mesurer les teneurs maximales autorisées par les règlements européens, trop basses pour cette technique.

Elle a donc été remplacée avantageusement par la chromatographie liquide haute performance (CLHP) qui est particulièrement intéressante pour la détermination des très basses concentrations, pour la spécificité de ses modes de détection et pour ses possibilités d'automatisation. De nombreux protocoles analytiques existent. La technique la plus couramment utilisée est la CLHP avec détecteur spectrofluorimétrique. Les propriétés naturelles de certaines mycotoxines à fluorescer sont exploitées (zéaralénone, ochratoxine A) ; pour d'autres on exalte leur fluorescence, par exemple par dérivation post-colonne à l'iode ou au brome dans le cas des aflatoxines. Certaines molécules comme les fumonisines sont rendues fluorescentes par dérivation pré-colonne avec l'ortho-phthaldialdéhyde. La CLHP avec détecteur spectrophotométrique est utilisée pour les analyses de patuline, de nivalénol et déoxynivalénol. On voit actuellement se développer une technique de détection plus coûteuse : la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

La chromatographie en phase gazeuse est surtout utilisée pour la détection de molécules du groupe des trichothécènes dans les céréales, avec détection par capture d'électron ou spectrométrie de masse.

Les tests immuno-enzymatiques (ELISA) sont souvent considérés comme une méthode de tri. Cette technique est rarement retenue dans les méthodes normalisées et doit toujours être associée à une étape de confirmation par méthode classique.

Préparation des solutions étalon

Dans le cas où le laboratoire fait le choix d'acheter des poudres de mycotoxines, il est nécessaire de prendre toutes les précautions pour leur manipulation [6].

L'élaboration de solutions standard à partir de poudre demande rigueur et précaution, leur coût est abordable.
Cependant, les fournisseurs ne garantissent pas la quantité conditionnée ; il est donc indispensable, dans le cas où les mycotoxines absorbent dans l'ultraviolet, de déterminer la concentration massique de la solution préparée par tracé du spectre UV selon le protocole décrit dans les méthodes de référence en tenant compte du coefficient d'absorption molaire associé au solvant de dilution. L'approvisionnement est parfois long car la signature de documents administratifs est souvent nécessaire afin d'attester que la mycotoxine convoitée sera utilisée à des fins analytiques. Des solutions certifiées sont également commercialisées. Elles offrent l'avantage d'éviter les manipulations délicates de poudre de mycotoxines ou de solutions concentrées. La concentration de ces solutions étant garantie, il n'y a pas de contrôle au spectrophotomètre UV à effectuer. Des mélanges de mycotoxines sont commercialisés, par exemple le mélange des quatre aflatoxines B1, B2, G1 et G2. Ces solutions prêtes à l'emploi sont pratiques d'utilisation mais sont coûteuses à l'achat.
Quel que soit le choix du laboratoire, il est nécessaire, pour avoir de bons résultats, de respecter les phases de contrôle préconisées.

Conclusion

Depuis une dizaine d'années, les moyens analytiques mis en œuvre ont évolué vers des limites de détection plus basses ce qui permet de répondre au besoin de contrôle analytique nécessaire à l'application de la réglementation actuelle. Mais les travaux concernant le contrôle des mycotoxines ne sont pas terminés. D'autres méthodes avec des seuils de détection plus bas encore, avec un champ d'application plus large, concernant d'autres mycotoxines seront nécessaires pour assurer la sécurité alimentaire du consommateur.

RÉFÉRENCES

1. Directive 98/53/CE de la Commission du 16 juillet 1998 portant fixation de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. Journal Officiel des Communautés européennes L 201.

2. Directive 2002/26/CE de la Commission du 13 mars 2002 portant fixation de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en ochratoxine A dans les denrées alimentaires. Journal Officiel des Communautés européennes L 75.

3. Directive 2002/27/CE de la Commission du 13 mars 2002 modifiant la directive 98/53/CE portant fixation de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. Journal Officiel des Communautés européennes L 75.

4. Aliments des animaux — Détermination de la teneur en aflatoxine B1 dans les aliments composés — Méthode par chromatographie liquide à haute performance. Norme Internationale ISO 14718 (Numéro de référence ISO 14718 : 1998).

5. Dosage des fumonisines B1 et B2 dans le maïs – Méthode CLHP avec purification par extraction en phase solide. Norme européenne NF EN 13585 Février 2002.

6. ROUSSELIN X, DAYAN-KENIGSBERG J, PLEVEN C, CASTEGNARO M, PICOT A, ZAJDELA F (1994). Manipulation des substances génotoxiques utilisées au laboratoire. Edition INRS Paris cedex 14 ED 769. n